

ARTIFICIAL TISSUE CONTAINING TISSUE-ATTACHED ORGAN-LIKE STRUCTURE AND ITS PRODUCTION

Patent number: JP10136977
Publication date: 1998-05-26
Inventor: TAKAHASHI HIDEKAZU; KITANO TOMONORI;
ISHIBASHI TAKUYA; KAWAMURA YOSHIHISA
Applicant: TOYO BOSEKI
Classification:
- international: A61F2/10; A61K35/36; A61L27/00; C12N5/06;
G01N33/15; A61F2/10; A61K35/36; A61L27/00;
C12N5/06; G01N33/15; (IPC1-7): A61K35/36;
G01N33/15; C12N5/06; A61F2/10; A61L27/00
- european:
Application number: JP19960298661 19961111
Priority number(s): JP19960298661 19961111

[Report a data error here](#)

Abstract of JP10136977

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce the subject tissue useful for drug efficacy tests and safety tests and useful as biomaterials, etc., by laminating a collagen gel layer containing 'tissue- attached organ cells' (cells constructing a tissue-attached organ) on a collagen gel layer containing 'contraction agent cells' (cells having function to contract collagen matrix), culturing the resultant laminate and subsequently inoculating epithelial cells on the surface of the cultured laminate, followed by culturing. **SOLUTION:** A collagen matrix layer consisting of collagen gel layer containing at least one kind of cells constructing a tissue-attached organ such as hair papilla cell, etc., is laminated on a collagen matrix layer consisting of a collagen gel layer containing contraction agent cells such as fibroblast, etc., to form a laminate having at least two layers, and the resultant laminate is cultured. Subsequently, epithelial cells such as corneal cells of epidermis are inoculated on at least one surface of the laminated collagen matrix layer, and the inoculated laminate is cultured to produce a tissue-attached organ-like structure such as skin-attached organ-like structure. Thus, the objective artificial tissue including a tissue-attached organ-like structure useful for drug efficacy tests and safety tests of medicines, cosmetics, etc., or useful as biomaterials, etc., is obtained.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

DI

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-136977

(43) 公開日 平成10年(1998) 5月26日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00 E
A 6 1 F 2/10		A 6 1 F 2/10
A 6 1 L 27/00		A 6 1 L 27/00 C
// A 6 1 K 35/36	ADA	A 6 1 K 35/36 ADA
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15 Z
審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 6 頁)		

(21) 出願番号 特願平8-298661

(22) 出願日 平成 8 年 (1996) 11 月 11 日

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 2 番 8 号

(72) 発明者 高橋 秀和

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 北野 友紀

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 石橋 卓也

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織付属器官様構造体を含む人工組織およびその製造方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 医薬品、化粧品、化粧品の薬効試験、安全性試験、または生体材料として利用するのに適した組織付属器官様構造体を含む人工組織およびその製造方法の提供。

【解決手段】 収縮剤細胞を含むコラーゲンマトリックス層と、組織付属器官を構成する細胞を少なくとも1種含むコラーゲンマトリックス層が、少なくとも2層重層してなる支持体の一部に、組織付属器官様構造体を有し、さらに、該支持体の少なくとも1方の表面上に上皮細胞層を有することを特徴とする組織付属器官様構造体を含む人工組織およびその製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 収縮剤細胞を含むコラーゲンマトリックス層と、組織付属器官を構成する細胞を少なくとも1種含むコラーゲンマトリックス層が、少なくとも2層重層してなる支持体の一部に組織付属器官様構造体を有し、さらに、該支持体の少なくとも1方の表面上に上皮細胞層を有することを特徴とする組織付属器官様構造体を含む人工組織。

【請求項2】 コラーゲンマトリックス層がコラーゲンゲル層である請求項1記載の組織付属器官様構造体を含む人工組織。

【請求項3】 収縮剤細胞が繊維芽細胞であり、かつ上皮細胞が表皮角化細胞である請求項1記載の組織付属器官様構造体を含む人工組織。

【請求項4】 組織付属器官様構造物が皮膚付属器官様構造物である請求項1項記載の組織付属器官様構造体を含む人工組織。

【請求項5】 組織付属器官を構成する細胞が毛乳頭細胞である請求項1項記載の組織付属器官様構造体を含む人工組織。

【請求項6】 組織付属器官様構造物が毛包様構造物である請求項1項記載の組織付属器官様構造体を含む人工組織。

【請求項7】 繊維芽細胞を含むコラーゲンゲル層と、毛乳頭細胞を含むコラーゲンゲル層が、少なくとも2層重層してなる支持体からなり、該支持体中の毛乳頭細胞を含むコラーゲンゲル層中または収縮剤細胞を含むコラーゲンゲル層と毛乳頭細胞を含むコラーゲンゲル層の界面部分に、毛包様構造物を有し、さらに、上記毛乳頭細胞を含むコラーゲンゲル層表面上に表皮角化細胞層を有する組織付属器官様構造体を含む人工組織。

【請求項8】 収縮剤細胞を含むコラーゲンマトリックス層と、組織付属器官を構成する細胞を少なくとも1種含むコラーゲンマトリックス層を少なくとも2層重層し、培養した後、該重層したコラーゲンマトリックス層の少なくとも1方の表面上に上皮細胞を播種し、培養し、組織付属器官様構造体を形成させることを特徴とする組織付属器官様構造体を含む人工組織の製造方法。

【請求項9】 コラーゲンマトリックス層がコラーゲンゲル層である請求項8記載の組織付属器官様構造体を含む人工組織の製造方法。

【請求項10】 収縮剤細胞が繊維芽細胞であり、かつ上皮細胞が表皮角化細胞である請求項8記載の組織付属器官様構造体を含む人工組織の製造方法。

【請求項11】 形成される組織付属器官様構造物が皮膚付属器官様構造物である請求項8記載の組織付属器官様構造体を含む人工組織の製造方法。

【請求項12】 組織付属器官を構成する細胞が毛乳頭細胞である請求項8の組織付属器官様構造体を含む人工組織の製造方法。

【請求項13】 形成される組織付属器官様構造物が毛包様構造物である請求項8記載の組織付属器官様構造体を含む人工組織の製造方法。

【請求項14】 下記工程からなる組織付属器官様構造体を含む人工組織の製造方法。

a. 少なくとも1種の収縮剤細胞を含む第1細胞群、コラーゲン溶液および栄養培地を混合し、これを鋳型容器中でゲル化させることにより、第1コラーゲンゲル層を形成させ、

b. 組織付属器官を構成する細胞を少なくとも1種含む第2細胞群、コラーゲン溶液および栄養培地を混合し、ゲル化した該第1コラーゲンゲル層の上に重層し、ゲル化させることにより、第2コラーゲンゲル層を形成させ、

c. 該工程aと該工程bを少なくとも1回以上繰り返すことにより、多層状のコラーゲンゲルを作製し、

d. 該収縮剤細胞が該多層状のコラーゲンゲルを収縮せしめるに十分な条件下に維持させ、

e. 該収縮したコラーゲンゲル層の少なくとも1方の表面上に上皮細胞を播種し、

f. 該収縮したコラーゲンゲルに含まれた細胞群と該上皮細胞との生長により、組織付属器官様構造体を形成するに十分な条件下に維持する。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は医薬品、化粧品、薬効試験、安全性試験、または生体材料として利用するのに適した組織付属器官様構造体を含む人工組織およびその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来より医薬品、化粧品など人体に直接、適用される物質については、その開発段階において種々の薬効試験、薬理試験、安全性試験が行われている。通常、これらの試験では、マウス、ラットなどを用いた動物実験が行われているが、経費、時間、データの信頼性などの問題に加え、最近では動物愛護の観点から、動物実験の見直しが求められている。これを受け、様々な動物実験代替法が開発されている。これらの方法のうち、培養細胞を用いた細胞試験では、単層に培養した単一種類の細胞が用いられることが多い。しかし、体内では単一種類の細胞が孤立して存在しているわけではなく、種々の細胞が相互に作用して、それぞれの細胞の生存と機能保持を行っている。そこで、より生体に近い結果を得るには、多種類の細胞の相互作用を重視し、細胞の三次元配列をも考慮したモデル系を用いる必要がある。また、さらに高次な組織間の作用を検出する場合は、複数の組織器官を含んだ、より高次な人工組織モデル系を構築する必要がある。

【0003】また、臨床の場合においては、創傷、熱傷の被覆材として、また整形用移植器材として、人工材料を

用いた種々の人工組織の開発が行われ、適用されてきた。しかし、これらは人工物であるがゆえ、生体適合性や治癒後の形状等の点において問題が指摘されている。これを受け、近年の細胞生物学の進歩に伴い、人工組織作製のため積極的に細胞培養技術を応用しようとする試みが行われつつある。

【0004】このような状況により、現在までに種々の細胞培養技術を応用した人工組織や、その製造方法が開発されてきた。例えば、人工皮膚を例に挙げると、繊維芽細胞をコラーゲンゲル内で培養し、ゲルが収縮した後、そのゲルの上に表皮角化細胞を播種、培養したものに、そのゲルの上に表皮角化細胞を播種、培養したもの（米国特許第4,485,096号明細書）、やナイロンメッシュに繊維芽細胞を播種、培養してメッシュ空孔が繊維芽細胞の分泌物により埋まった時点でその上に表皮角化細胞を播種、培養したもの（Slivka, S.R., et al. J. Invest. Dermatol. 96:544A, 1991）、あるいはコラーゲンスポンジに繊維芽細胞を播種、培養した後、フィルム状のコラーゲンスポンジを重ね、さらに表皮角化細胞を播種、培養したもの（特開平6-292568号公報）などがある。

【0005】一方、生体内において各種組織器官は、一般的に種々の組織付属器官を伴っている。例えば、皮膚は表皮層、真皮層を主な構成要素とするが、それ以外に毛包や汗腺、皮脂腺といった皮膚器官を有している。しかしながら、前記人工皮膚は繊維芽細胞と表皮角化細胞の2種類の細胞によって構成されているため、真皮層及び表皮層に類似した構造は認められるものの、毛包や汗腺等の皮膚器官や毛細血管、筋肉、脂肪などの皮下組織は存在せず、これら組織付属器官をも含めた人工組織を構築するには至っていない。よって、このような人工組織では組織付属器官を標的とした薬効性試験、安全性試験を行うことはできず、また、移植材として適用しても組織付属器官の再生は困難である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明では、かかる従来の問題点を解消すべく組織付属器官様構造体を含む人工組織及びその製造方法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討を行った結果、収縮剤細胞を含むコラーゲンゲルと、組織付属器官を構成する細胞を少なくとも1種含むコラーゲンゲルを少なくとも2層重層し、培養した後、該コラーゲンゲル表面上に上皮細胞を播種し、培養し、組織付属器官様構造体を形成させる方法を見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち、本発明は収縮剤細胞を含むコラーゲンマトリックス層と、組織付属器官を構成する細胞を少なくとも1種含むコラーゲンマトリックス層が、少なくとも2層重層してなる支持体の一部に組織付属器官様構造体を有し、さらに、該支持体の少なくとも1方の

表面上に上皮細胞層を有することを特徴とする組織付属器官様構造体を含む人工組織である。

【0009】また、本発明は収縮剤細胞を含むコラーゲンマトリックス層と、組織付属器官を構成する細胞を少なくとも1種含むコラーゲンマトリックス層を少なくとも2層重層し、培養した後、該重層したコラーゲンマトリックス層の少なくとも1方の表面上に上皮細胞を播種し、培養し、組織付属器官様構造体を形成させることを特徴とする組織付属器官様構造体を含む人工組織の製造方法である。

【0010】

【発明の実施態様】本発明における組織付属器官とは、本体となる組織に属した器官を指す。例えば、皮膚組織については、毛包、皮脂腺、乳腺、汗腺、爪などの皮膚器官や、皮下脂肪などの皮下組織がそれに当たる。さらに、組織の維持に関わる毛細血管、末梢神経なども組織付属器官に含まれる。また、組織付属器官を構成する細胞とは、生体内で組織付属器官を構成している細胞を指し、具体的には、毛乳頭細胞、皮脂腺細胞、乳腺細胞などであり、また血管内皮細胞もこれに含まれる。本発明における組織付属器官様構造体とは、かかる組織付属器官に形態のおよび/あるいは生化学的に類似した性質を有する組織構造物を指す。該構造体は上記組織付属器官を構成する細胞と上皮細胞との相互作用により、内因的に形態変化、分化誘導が起り、培養により成形したものである。

【0011】本発明におけるコラーゲンマトリックス層とは、コラーゲン繊維の格子からなる細胞の支持体を意味する。コラーゲンマトリックスは、ゲル状あるいはスポンジ状の形状を有するが、本発明においてはコラーゲンゲルを用いることにより、細胞との混合、培養が好適に行うことができる。

【0012】本発明における、収縮剤細胞とはコラーゲンマトリックス中のコラーゲン繊維と結合し、その生長によりコラーゲン繊維を再配列させ、かかる作用によりコラーゲンマトリックスを収縮させる性質を有する細胞である。このような収縮剤細胞としては、例えば、繊維芽細胞、平滑筋細胞、横紋筋細胞などが挙げられる。

【0013】本発明における上皮細胞とは、生体内において上皮組織を構成する細胞を指し、具体的には、表皮角化細胞、食道上皮細胞、粘膜上皮細胞などが挙げられる。

【0014】本発明の人工組織は収縮剤細胞を含むコラーゲンマトリックス層と、組織付属器官を構成する細胞を少なくとも1種含むコラーゲンマトリックス層が、少なくとも2層重層してなる支持体の一部に、組織付属器官様構造体を有し、さらに、該支持体の少なくとも1方の表面、好ましくは組織付属器官を構成する細胞を少なくとも1種含むコラーゲンマトリックスの表面上に上皮細胞層を有する。前者であるコラーゲンマトリックス層

には、収縮剤細胞が、好ましくは $0.1 \sim 10 \times 10^7$ 個/cmの濃度で含まれる。また、その形状は、 $100 \sim 1000 \mu\text{m}$ 程度の厚さを有する平板状の形態を示す。後者であるコラーゲンマトリックス層には、組織付属器官を構成する細胞が少なくとも1種、好ましくは $0.1 \sim 10 \times 10^7$ 個/cmの濃度で含まれる。また、その形状は、 $10 \sim 100 \mu\text{m}$ 程度の厚さを有する平板状の形態を示す。

【0015】本発明において、組織付属器官様構造体は少なくとも2層重層してなる支持体の一部に存在する。少なくとも2層重層してなる支持体の一部とは、該支持体の組織付属器官を構成する細胞を少なくとも1種含むコラーゲンマトリックス層中または収縮剤細胞を含むコラーゲンマトリックス層と組織付属器官を構成する細胞を少なくとも1種含むコラーゲンマトリックス層の界面部分に位置する部位を指す。このような状態に位置する組織付属器官様構造体は、好ましくは $1 \sim 50$ 個/cm²の密度で存在する。

【0016】本発明において、上皮細胞層は該支持体の少なくとも1方の表面、好ましくは組織付属器官を構成する細胞を少なくとも1種含むコラーゲンマトリックスの表面上に存在する。

【0017】本発明における製法は、収縮剤細胞を含むコラーゲンマトリックス層と、組織付属器官を構成する細胞を少なくとも1種含むコラーゲンマトリックス層を少なくとも2層重層し、培養した後、該重層したコラーゲンマトリックス層の少なくとも1方の表面に上皮細胞を播種し、培養し、組織付属器官様構造体を形成させることを特徴とする組織付属器官様構造体を含む人工組織の製造方法である。本発明における組織付属器官様構造体を含む人工組織は、具体的には、例えば以下の方法によっても得られる。すなわち、

- a. 少なくとも1種の収縮剤細胞を含む第1細胞群、コラーゲン溶液および栄養培地を混合し、これを鋳型容器中でゲル化させることにより、第1コラーゲンゲル層を形成させ、
- b. 組織付属器官を構成する細胞を少なくとも1種含む第2細胞群、コラーゲン溶液および栄養培地を混合し、ゲル化した該第1コラーゲンゲル上に重層し、ゲル化させることにより、第2コラーゲンゲル層を形成させ、
- c. 該工程aと該工程bを少なくとも1回以上繰り返すことにより、多層状のコラーゲンゲルを作製し、
- d. 該収縮剤細胞が該多層状のコラーゲンゲルを収縮せしめるに十分な条件下に維持させ、
- e. 該収縮したコラーゲンゲル層の少なくとも1方の表面上に上皮細胞を播種し、
- f. 該収縮したコラーゲンゲルに含まれた細胞群と該上皮細胞との生長により、組織付属器官様構造体を形成するに十分な条件下に維持する、ことにより得る。

【0018】第1細胞群には、収縮剤細胞以外に、必要

により、各種動物細胞を含んでも構わない。これら本発明に用いられる細胞は、動物から適当な組織を摘出し、これを源に培地中で培養を行うことによって得る。起源とする動物としては、特に限定しないが、ヒトあるいはラット等が挙げられる。また、これら細胞を、商業的に販売されている製品として得ても良い。

【0019】本発明におけるコラーゲン溶液とは、コラーゲン分子が分散あるいは溶解している酸性の水溶液である。コラーゲン溶液の調製方法としては、例えば動物の腱や尾などを源として酸性条件下で抽出操作を行うことにより調製される。コラーゲン溶液中のコラーゲンの濃度は、好ましくは $0.3 \sim 3 \text{ mg/ml}$ に調整する。また、このコラーゲン溶液は商業的に販売されている製品として得ても良い。また、本発明における栄養培地とは、細胞の維持に必要な培地成分を有し、かつコラーゲン溶液のpHをゲル化させるに十分な量まで上昇せしめる塩基を含むものである。例えば、適当なpHを有する基礎培地などが挙げられる。また、必要であればこれに血清成分を加える。

【0020】これら各要素（少なくとも1種の収縮剤細胞を含む第1細胞群、コラーゲン溶液および栄養培地）を良く混合し、鋳型容器中にてゲル化させる。各要素の混合は、コラーゲンがゲル化する前に素早く行うことが好ましい。ゲル化に用いる鋳型容器としては特に限定しないが、平坦な底面を有する円筒形や角形の容器を用いることができる。また、細胞への栄養分の供給などの見地から、底面は多孔性の基材である方が好ましい。この混合溶液をゲル化させる方法としては、例えばコラーゲン溶液に栄養培地を加えてpHを上げ、さらに $10 \sim 40^\circ\text{C}$ 、より好ましくは $20 \sim 37^\circ\text{C}$ で保温し、この状態でしばらく静置する。この条件において、コラーゲン分子は会合し、コラーゲン繊維が形成され、ゼリー状のゲルができる。これにより、第1コラーゲンゲル層を形成させる。

【0021】第2細胞群に含まれる細胞としては、生体において付属器官を構成する細胞、例えば毛乳頭細胞、内皮細胞、乳腺細胞、神経細胞などから選択する。また、必要であれば、適宜、その他の細胞を含んでも構わない。これら第2細胞群を他の要素（コラーゲン溶液および栄養培地）と良く混合した後、ゲル化した第1コラーゲンゲル層の上に重層し、これをゲル化させる。また、必要であれば、さらにコラーゲンゲルを重層する。

【0022】かかる工程により得られた多層状のコラーゲンゲルを、適当な条件下で培養すると、収縮剤細胞の作用により、コラーゲン繊維の再配列が起き、水溶液が圧出され、コラーゲンゲルが収縮する。コラーゲンゲルを培養する方法としては、例えば10%牛血清含有ダルベッコ変法イーグル培地にて培養を行う。この条件で、数時間の内に収縮が始まり、時間が経ることに収縮が増す。こうして約3～20日間、好ましくは5～7日間培

(5)

7

養することにより、コラーゲン繊維が密に集積し、三次元的に細胞が封入されたコラーゲンマトリックスが形成される。こうして収縮したコラーゲングルが形成される。

【0023】収縮したコラーゲングル層の少なくとも1方の表面、好ましくは組織付属器官を構成する細胞を少なくとも1種含むコラーゲングルマトリックスに上皮細胞を播種する方法としては、特に限定しないが、細胞懸濁液を直接、収縮したコラーゲングル表面上にのせ、細胞がかかるゲル上で伸展するまで静置することにより行う。これを適当な条件下に維持、培養すると、コラーゲンゲルに含まれる細胞群と上皮細胞との相互作用により、内因的に形態変化、分化誘導が起こり、組織付属器官様構造体が形成される。これは、発生学的な器官形成と類似した作用によるものと考えられる。該構造物を形成させる培養条件としては、使用した細胞に応じて適宜、選択する必要があるが、収縮したコラーゲングル表面上の上皮細胞を空气中で露出させた状態で培養するエアリキッドインターフェイス培養法などがあげられる。

【0024】本発明方法により、例えば、第1コラーゲングル層に繊維芽細胞を、第2コラーゲングル層に毛乳頭細胞を封入し、上皮細胞として表皮角化細胞を播種し、培養した場合、毛包様の構造体および/あるいは毛幹様の構造体を含んだ培養皮膚モデルが作製される。

【0025】

【実施例】次に、本発明を具体的に実施例にて説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

参考例1 コラーゲングル層の作製

オルガノジェネシス社から購入したヒト繊維芽細胞を10%牛血清含有ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)にて培養し、コンフレントに達した後、同培地にて細胞を回収し、繊維芽細胞懸濁液を得た。毛乳頭細胞は、実体顕微鏡下でラット頬髭毛包より毛乳頭を分離し、コラーゲンでコート処理した35mmプラスチックシャーレ(コーニング社製)を用い、10%牛血清含有DMEM培地にて培養を行し、遊走した毛乳頭細胞がコンフレントに達したところで継代した。実験には、7~8継代目のものを用いて行い、同培地にて細胞を回収し、毛乳頭細胞懸濁液を得た。

【0026】コラーゲングル層の作製方法はベルらの方法(Bell, E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1274-1279, 1979)に準じて行った。すなわち、4℃にて9容量のコラーゲン溶液(オルガノジェネシス社製)に1容量の10倍濃度のイーグル最小必須培地(EMEM、ギブコ社製)を加え、重曹をpHが中性付近になるまで攪拌しながら加えた。さらに10%量の牛血清を加えた後、上記繊維芽細胞懸濁液を、最終細胞濃度が 2.5×10^4 個/mlになるようゆっくり加え、良く攪拌した。か

かる混合溶液を6穴プレートに入ったトランスウェル(コースター社製)の内側に3mlずつ加え、室温にて15分間静置し、ゲル化させ繊維芽細胞を含む第1コラーゲングル層を作製した。続いて、4℃にて9容量の氷冷したコラーゲン溶液(オルガノジェネシス社製)に1容量の10倍濃度のEMEM(ギブコ社製)を加え、重曹をpHが中性付近になるまで攪拌しながら加えた。さらに10%量の牛血清を加えた後、上記毛乳頭細胞懸濁液を、最終細胞濃度が $0.5 \sim 1 \times 10^5$ 個/mlになるようゆっくり加え、良く攪拌した。これをゲル化した第1コラーゲングル層の上に0.5ml重層し、さらに15分以上室温にて静置させることによりゲル化させ、毛乳頭細胞を含む第2コラーゲングル層を作製した。かかる多層状のコラーゲンゲルに10%牛血清含有DME M培地を静かに添加し、37℃、10%CO₂下で5~7日間培養し、コラーゲンゲルを収縮させた。

【0027】実施例1 組織付属器官様構造体を含む人工組織の作製

表皮角化細胞の播種および培養はベルらの方法(Parent eau, N.L., et al., J. Cellular Biochem., 45, 245-249, 1991)に準じて行った。すなわち、オルガノジェネシス社から購入したヒト表皮角化細胞をCa無添加DMEM:ハムF12培地=3:1を基礎とするエピダーマリゼーション(Epidermalization)用培地(東洋紡製)に懸濁し、培地を抜き去ったコラーゲンゲルの表面に、前記表皮角化細胞懸濁液を、該細胞が $0.5 \sim 1 \times 10^5$ 個/cm²になるように添加した。次いで、同培地を静かに添加し、37℃、10%CO₂下で3~5日間培養し、表皮角化細胞を充分伸展させた。次に、Ca無添加DMEM:ハムF12培地=1:1を基礎とする維持(Maintenance)用培地(東洋紡製)を、第1コラーゲングル層および第2コラーゲングル層(真皮層)が培養液下で、かつ第2コラーゲングル層上の表皮角化細胞が空气中に出るように添加し、37℃、10%CO₂下で10~15日間培養して、組織付属器官様構造体を含む人工組織を作製した。

【0028】実施例2 組織付属器官様構造体の確認
実施例1にて得られた人工組織をホルマリン固定し、切片作製後、HE染色を行った。得られた組織切片像を図1および図3に示す。図1では組織付属器官様構造体として、毛乳頭細胞が毛包様細胞塊に成長し、毛包状の球状塊を形成し、皮膚に非常によく似た構造を持つ培養物が得られた。図2は図1中の組織を説明する模式図である。図3では第2コラーゲンゲル(真皮層)部に細胞が表皮層部に組織付属器官様構造体として、毛乳頭細胞が成長した毛幹様の角化した領域があるのが確認された。図4は図3中の組織を説明する模式図である。

【0029】

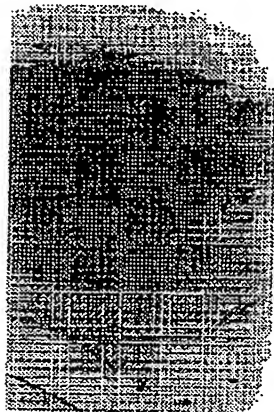
【発明の効果】本発明は、生体組織と形態的におよび/あるいは生化学的に類似した組織付属器官様構造体を含

9

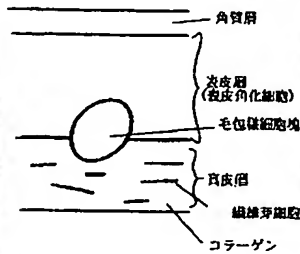
む人工組織を提供することができる。よって、これを動物実験代替のモデル系として利用することにより、より生体に近いかたちで、薬効試験や安全性試験を行うことができる。さらに、移植用の生体材料としても用いることができる。

【図面の簡単な説明】

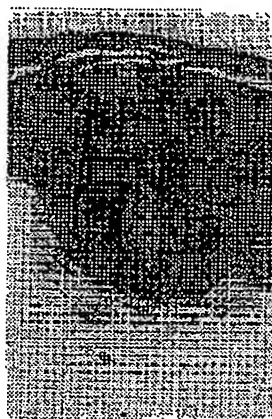
【図1】



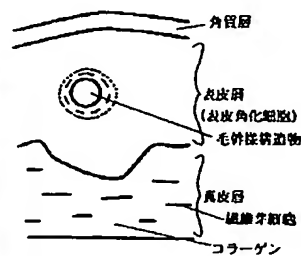
【図2】



【図3】



【図4】



(6)

特開平10-136977

10

*【図1】毛包様構造体を含む人工皮膚のHE染色像を示した図面に代わる写真である。

【図2】図1中の組織を説明する模式図である。

【図3】毛幹様の構造体を含む人工皮膚のHE染色像を示した図面に代わる写真である。

*【図4】図2中の組織を説明する模式図である。

フロントページの続き

(72)発明者 川村 良久

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

THIS PAGE BLANK (USPTO)